



Docket No.: 43888-067

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of	:	
Keiko YUGAWA, et al.	:	
Serial No.: 09/406,832	:	Group Art Unit: 1743
Filed: September 28, 1999	:	Examiner: A. Noguerola
For: GLUCOSE SENSOR	:	

DECLARATION UNDER 37 C.F.R. § 1.132
TOSHIHIKO YOSHIOKA

1. I, Toshihiko Yoshioka, willfully make the following Declaration regarding the above-captioned application. I declare and say as follows:

2. I am one of the listed inventors to the above-captioned application and an employee of the Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., the assignee of the application.

3. I am also one of the listed authors to Japanese Patent Publication Hei 10-227755, attached hereto as Exhibit A (hereinafter referred to as "Hei 10-227755"). This patent is also assigned to the Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.

4. In paragraph [0007], the Hei 10-227755 reference discloses examples of hydrophilic macromolecules that can be contained in a reaction layer.

5. Maleic acid or anhydride is listed among the examples of hydrophilic macromolecule disclosed in paragraph [0007] of the Hei 10-227755.

6. The listing of maleic acid or anhydride as an example of a hydrophilic macromolecule is not correct and one skilled in this art would recognize that the listing of maleic acid or anhydride as a hydrophilic macromolecule in a reaction layer is an error.

7. As discussed on pages 11-12 of the above-captioned application, polymers of maleic anhydride and maleates can serve as hydrophilic polymers in reaction layers.

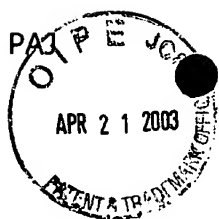
09/406,832

8. As one skilled in the art would understand, it is the polymeric or macromolecular form of the maleic acid, salt or anhydride thereof that can serve as a hydrophilic macromolecule and not the monomer itself, as indicated in the erroneous description of Hei 10-227755.

9. I declare further that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Toshihiko Yoshida
Name of Declarant

April 17, 2003
Date



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 10-227755
(43) Date of publication of application : 25.08.1998

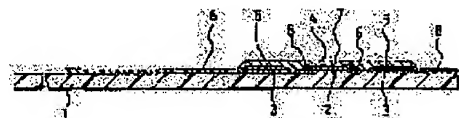
(51) Int. Cl. G01N 27/327
C12Q 1/32

(21) Application number : 09-030239 (71) Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD
(22) Date of filing : 14.02.1997 (72) Inventor : YOSHIOKA TOSHIHIKO
TSUJI SATOKO
NANKAI SHIRO

(54) BIOSENSOR

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To avoid effect of dissolved oxygen, by forming a reaction layer containing dehydrogenase and electron acceptor which are combined using pyrrolo quinoline quinone as coenzyme on a electrode system consisting of an action electrode and a counter electrode on a substrate.
SOLUTION: Leads 2, 3 are formed on an electrical insulating substrate 1 in screen printing method of silver paste, and an action electrode 4 which connects with the lead 2 is formed in printing method of conductive carbon paste. An insulating layer 6 is formed on the substrate 1 in printing method of insulating paste to cover outer peripheral of the action electrode 4, and a counter electrode 5 which connects with the lead 3 is formed in printing method of conductive carbon paste. A reactive layer 7 is formed on the substrate 1 on which electrodes are formed. The reactive layer 7 contains dehydrogenase and electron acceptor which are combined using pyrrolo quinoline quinone as coenzyme, only the electron acceptor is reduced following enzyme reaction of the reactive layer with matrix, and therefore, concentration of the matrix can be accurately measured. Thus, matrix in a biomedical sample or specimen such as food material can be measured accurately.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

Japanese Laid-Open Patent Publication

Publication Number: Heisei 10 (1998) 227755

Date of Publication: August 25, 1998

[Title of Invention] Biosensor

[Abstract]

[Problem]

A biosensor is needed which can measure the concentration of a substrate such as glucose without being affected by the presence of oxygen dissolved in the sample liquid.

[Means of Solution]

The biosensor of the present invention comprises an electrically insulating base plate, an electrode system having a working electrode and a counter electrode formed on said base plate, and a reaction layer formed on said electrode system, wherein said reaction layer contains a dehydrogenase and electron acceptor, said dehydrogenase being combined with pyrroloquinoline quinone as coenzyme.

[Claims]

1. A biosensor comprising an electrically insulating base plate, an electrode system having a working electrode and a counter electrode formed on said base plate, and a reaction layer formed on said electrode system, said sensor being characterized by said reaction layer that contains dehydrogenase and electron acceptor, said dehydrogenase being combined with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme.
2. The biosensor according to claim 1, wherein said reaction layer further contains pyrroloquinoline quinone.
3. The biosensor according to claim 2, wherein the content of said pyrroloquinoline quinone is from 1.5×10^{-6} to 1.5×10^{-4} grams per square centimeter of the reaction layer.
4. The biosensor according to claim 1 or 2, wherein a dehydrogenase, which is combined with said pyrroloquinoline quinone as coenzyme, is glucose dehydrogenase or fructose dehydrogenase.
5. The biosensor according to claim 4, wherein the quantity of said glucose dehydrogenase is from 1 unit to 200 units per square centimeter of the reaction layer.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Technical Field of the Invention]

This invention relates to a biosensor which can quantitatively measure a specified ingredient in a living-body sample such as blood or urine; or a raw material or product in the food industry including fruit juice quickly, easily, and with a high degree of precision.

[0002]

[Prior Art]

Biosensors which can quantitatively measure a specified ingredient in living-body samples or food without diluting or stirring the sample liquid have been proposed. For example, in the official publication of applied patent Heisei 3 (1991) 202764, a biosensor has been

disclosed in which an electrode system is formed on an insulating base plate by screen printing or other method and a reaction layer including an oxidoreductase and electron acceptor. This biosensor quantitatively measures the concentration of a specified ingredient in the sample as follows: First, the reaction layer is dissolved by dropping the sample onto the reaction layer, and an enzyme reaction proceeds between the specified ingredient in the sample liquid and the oxidoreductases in the reaction layer. This enzyme reaction reduces the electron acceptor. After a short interval, a voltage applied across the sensor electrodes electrochemically oxidizes the reduced electron acceptor. The concentration of the specified ingredient in the sample liquid is obtained quantitatively from the oxidation current of this reaction.

[0003]

[Problems to be Solved by the Invention]

It is known that among such biosensors, glucose oxidase as an oxidoreductase is commonly used to detect glucose. When glucose oxidase is used, however, the electron acceptor is reduced as part of the enzyme reaction, as is the enzyme dissolved in the sample liquid. Although the reduced electron acceptor can be readily oxidized electrochemically, hydrogen peroxide, a reduced byproduct of dissolved oxygen, cannot. Therefore, the value of the oxidation current obtained by applying a voltage across the sensor electrodes corresponds to the degree of oxidation of the reduced electron acceptor, not including the degree of oxidation of the hydrogen peroxide. The original concentration of the specified ingredient, accordingly, cannot be measured accurately using the obtained value of the oxidation current. To gain an accurate figure for the concentration of the specified ingredient, a preparatory process such as prior quantitative measurement of dissolved oxygen in the sample liquid was needed. This invention aims to offer a biosensor which can precisely measure the concentration of a specified ingredient such as glucose without being influenced by the presence of oxygen dissolved in the sample liquid.

[0004]

[Means of Solving the Problem]

To solve the above-mentioned problem, the biosensor of this invention comprises an electrically insulating base plate, an electrode system having a working electrode and a counter electrode formed on said base plate, and a reaction layer formed on said electrode system, wherein said reaction layer contains dehydrogenase and an electron acceptor, said dehydrogenase being combined with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme.

[0005]

[Embodiment of the Invention]

The biosensor of the invention is characterized by the reaction layer of the sensor containing dehydrogenase combined with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme. The dehydrogenase that is combined with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme reduces only the electron acceptor when the enzyme acts on the specified ingredient. Accordingly, the concentration of the specified ingredient can be measured accurately from the value of the oxidation current. As examples of dehydrogenase combined with pyrroloquinoline quinone as a coenzyme, glucose dehydrogenase and fructose dehydrogenase are included. Their optimal concentration is 1 to 200 units per square centimeter of the reaction layer; more preferably 4 to 100 units. One unit means the amount of oxidoreductase able to oxidize of 1 micro mole of the specified ingredient in one minute. If the content of glucose dehydrogenase is less than 1 unit per square centimeter of reaction layer, the above-mentioned oxidization time is prolonged to several minutes. If the amount of glucose dehydrogenase exceeds 200 units per square centimeter of the reaction layer, the production costs rise and the response current tends to disperse because the reaction layer cracks easily during manufacture.

[0006]

The reaction layer of this invention should ideally contain pyrroloquinoline quinone in addition to above-mentioned dehydrogenase, since the detection sensitivity improves and the concentration of the specified ingredient can be detected over a wider range. The sodium salt of pyrroloquinoline quinone can be used as the pyrroloquinoline quinone. The amount of pyrroloquinoline quinone is ideally 1.5×10^{-6} to 1.5×10^{-4} grams per square centimeter of the reaction layer; more preferably 1.0×10^{-5} to 8.0×10^{-5} grams. Furthermore, the reaction layer of this invention contains an electron acceptor. As examples of electron acceptors, ferricyanide ion, p-benzoquinone and its derivatives, phenazine methosulfate, methylene blue, and ferrocene and its derivatives are included. One or more of these are used as the electron acceptor. Ferricyanide ion shows the best performance.

[0007]

The reaction layer of the biosensor used in this invention may contain hydrophilic macromolecules in addition to the above-mentioned enzyme and electron acceptor. By adding a hydrophilic macromolecule to the reaction layer, detachment of the reaction layer from the surface of the electrode system can be prevented. Furthermore, cracking of the reaction layer is prevented, contributing overall to improved reliability of the biosensor. As examples of hydrophilic macromolecules, carboxymethyl cellulose, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, methyl cellulose, ethyl cellulose, ethyl hydroxyethyl cellulose, carboxymethylethyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol, polyamino acids such as polylysine, polystyrene sulfonic acid, gelatin and its derivatives, acrylic acid and its salts, metaacrylic acid and its salts, starch and its derivatives, and anhydrous maleic acid and its salts are included. Carboxymethyl cellulose shows the best performance. There are two methods for the measurement of oxidization current: the two-electrode method, in which only a working electrode and a counter electrode are used; and the more accurate three-electrode method, in which a reference electrode is added.

[0008]

[Embodiment Examples]

The invention will be hereafter described precisely using specific examples of embodiments. Figure 1 is the outline ground plan of the biosensor of this invention without the reaction layer. Leads 2 and 3 are formed on a base plate 1 made of polyethylene terephthalate by printing silver paste using screen printing. Working electrode 4 is then formed on base plate 1 by printing electroconductive carbon paste containing a resin binder. This working electrode makes electrical contact with lead 2. Furthermore, an insulating layer 6 is formed on the base plate 1 by printing insulating paste. Insulating layer 6 covers the peripheral part of working electrode 4, keeping the area of exposed part of working electrode 4 constant. A ring-shaped counter electrode 5 is formed on base plate 1 by printing electroconductive carbon paste containing resin binder so as to make electrical contact with lead 3. A synthetic resin board of such as polyethylene terephthalate is used as the insulating base plate. For the above-mentioned leads and electrodes, platinum, gold, palladium, etc. may also be used in addition to silver and carbon. Figure 2 shows a longitudinal section of a biosensor of this invention. As shown in Fig. 1, a reaction layer 7 containing enzymes and an electron acceptor is formed on insulating base plate 1 on which the electrode system is formed.

[0009]

[Embodiment Example 1]

On the electrode system of the base plate in Fig. 1, reaction layer 7 was formed by dropping a liquid mixture of glucose dehydrogenase (hereafter abbreviated to GDH) and potassium ferricyanide onto the base plate. The quantity of GDH contained in reaction layer 7 was 30 units per square centimeter of the reaction layer. Next, an aqueous solution of glucose was dropped onto reaction layer 7. When a sample liquid containing glucose is supplied to the

reaction layer, glucose in the sample is oxidized by the glucose dehydrogenase. At the same time, the electron acceptor in the reaction layer is reduced. One minute after dropping the liquid, a voltage of +0.5 V was applied to the working electrode 4 with reference to the counter electrode. The current was measured five seconds later. Because this current is proportional to the concentration of the generated reduced electron acceptor, that is, to the concentration of the specified ingredient in the sample liquid, the glucose concentration in the sample can be obtained by measuring the current. The samples were divided into two groups: the dissolved oxygen concentration was about 30 mmHg in one group and about 180 mmHg in the other. The glucose concentration in the sample was varied in each group. The results demonstrated a correlation between response current and glucose concentration. The linearity was fairly good regardless of the concentration of dissolved oxygen.

[0010]

[Example for Comparison 1]

Reaction layer 7 was formed in the same manner as in Embodiment Example 1 with the exception that glucose oxidase was used instead of glucose dehydrogenase. The correlation between the response current and glucose concentration was examined using the same samples as in Embodiment Example 1. The results revealed that the obtained response current varied according to the dissolved oxygen concentration with a slight tendency for a higher dissolved oxygen concentration to result in a smaller response current.

[0011]

[Embodiment Example 2]

An aqueous solution containing GDH, potassium ferricyanide, and pyrroloquinoline quinone (hereafter abbreviated to PQQ) was dropped onto the base plate shown in Fig. 2. Reaction layer 7 was then formed by drying the solution. The amount of GDH and PQQ contained in reaction layer 7 was 20 units and 4.5×10^{-5} grams per square centimeter of the reaction layer, respectively. The correlation between response current and glucose concentration was also examined using the same samples as in Embodiment Example 1. A much higher degree of correlation than in Embodiment Example 1 was obtained between response current and glucose concentration.

[0012]

[Embodiment Example 3]

An aqueous solution containing fructose dehydrogenase (hereafter abbreviated to FDH) and potassium ferricyanide was dropped onto the base plate 1 shown in Fig. 2. Reaction layer 7 was then formed by drying the solution. The correlation between response current and glucose concentration was also examined using the same samples as in Embodiment Example 1. A high correlation was obtained between response current and glucose concentration. In addition, this result was not influenced by the concentration of dissolved oxygen in the sample. Furthermore, it was recognized that the response improved when PQQ was added to the reaction layer.

[0013]

[Effect of the Invention]

According to this invention, a new biosensor can be obtained by which a specified ingredient contained in a living-body sample such as blood or urine; or samples of materials or products in the food industry can be measured accurately and rapidly.

[Brief Explanation of Drawings]

[Figure 1]

Figure 1 is an outline ground plan of an embodiment of the invention with the reaction layer omitted.

[Figure 2]

Figure 2 is a longitudinal section of the main part of the biosensor.

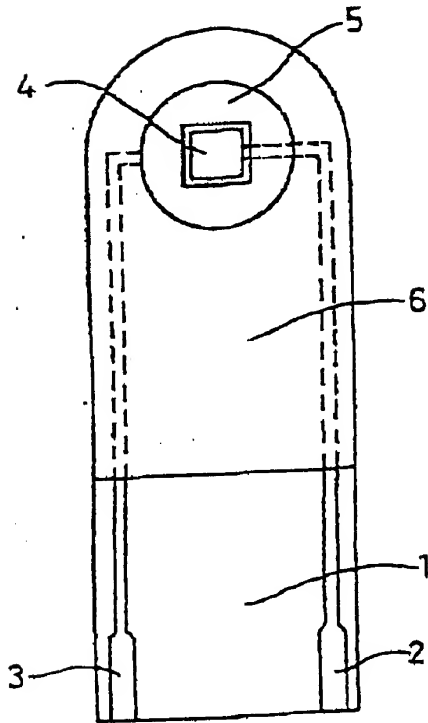
[Explanation of Marked Parts]

- 1 Electrically insulating base plate
- 2 and 3 Leads
- 4 Working electrode
- 5 Counter electrode
- 6 Insulating layer
- 7 Reaction layer



Japanese Laid-Open
Heisei 10-227755

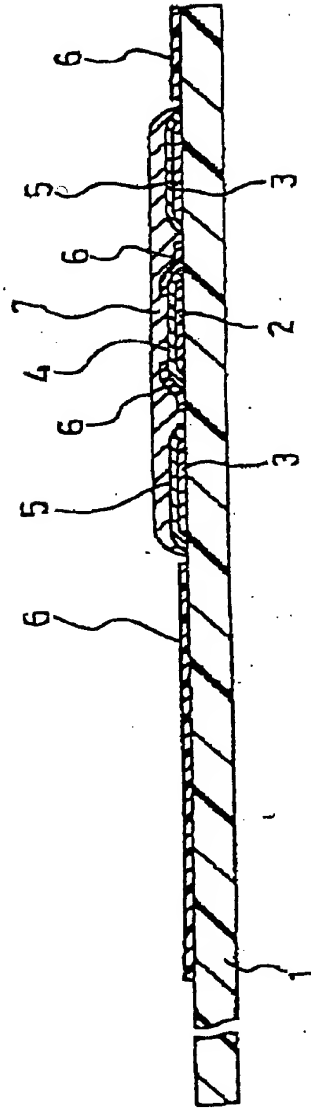
FIG. 1





Japanese Laid-Open
Heisei 10-227755

FIG. 2



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of :
Keiko YUGAWA, et al. :
Serial No.: 09/406,832 : Group Art Unit: 1743
Filed: September 28, 1999 : Examiner: A. Noguerola
For: GLUCOSE SENSOR :

**DECLARATION UNDER 37 C.F.R. § 1.132
KEIKO YUGAWA**

1. I, Keiko Yugawa, willfully make the following Declaration regarding the above-captioned application. I declare and say as follows:
2. I am one of the listed inventors to the above-captioned application and an employee of the Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., the assignee of the application.
3. I have read an am familiar with the Office Action dated 12/19/2002 and have read and familiar with the art cited against rejected claims 55 and 59-63 in the Office Action including the references to Crismore et al. (US 5,997,817); Vetter et al. (US 6,025,203) and Gotoh et al. (US 6,071,391).
4. Several experiments were carried out under my control and direction to compare the effect of succinic acid to sodium citrate in a glucose sensor. Two glucose sensors were prepared. The first glucose sensor was prepared according to Example 1 of the above-captioned application except succinic acid was used in place of potassium hydrogen phthalate. A second sensor was prepared in the same manner as the first sensor except sodium dihydrogen citrate was used in place of succinic acid.
5. The response characteristics of the two glucose sensors were taken at two intervals: approximately immediately after preparing the sensor (initial fabrication) and after subjecting the sensor to 50 °C for one week (i.e. after an accelerated aging

environment). A graph showing the response characteristics of these two sensors was prepared by measuring the current responses to various solutions containing various amounts of glucose, as described on page 17 of the above-captioned application. This graph is attached hereto as Exhibit A.

6. As shown in Exhibit A, the glucose sensor prepared with sodium citrate maintains substantially the same response when used either initially after fabrication (line with square symbol on graph) or after an accelerated aging (line with triangle symbol on graph). The largest difference between the response of the initial sensor and the sensor subjected to an accelerated aging was calculated to be only 7%. This Calculation was done at the largest deviation at about 540 mg/dl of glucose. Additionally, this response is approximately linear throughout a glucose concentration range of 0 to about 540 mg/dl. These results are significant in the performance of a glucose sensor and not expected.

7. In contrast, the sensor prepared with succinic acid varied in its performance when subjected to an accelerated aging. This result is seen in Exhibit A when comparing the response of the succinic acid sensor when used either initially after fabrication (line with circle as a symbol on graph) to the response of the sensor after an accelerated aging (line with diamond symbol on graph). As seen in Exhibit A, the succinic acid sensor has a substantial loss in activity at high glucose concentrations after accelerated aging. The largest difference between the response of the initial sensor and the sensor subjected to an accelerated aging was calculated to be 19% at about 540 mg/dl of glucose. Further, the aged sensor has a nonlinear response to glucose above a concentration of about 400 mg/dl, which reduces its accuracy and reliability.

8. These experimental results show that a sensor prepared with sodium citrate is more accurate and reliable over time than one made from succinic acid. This result is not suggested or recognized by the cited art in the Office Action of 12/19/2002.

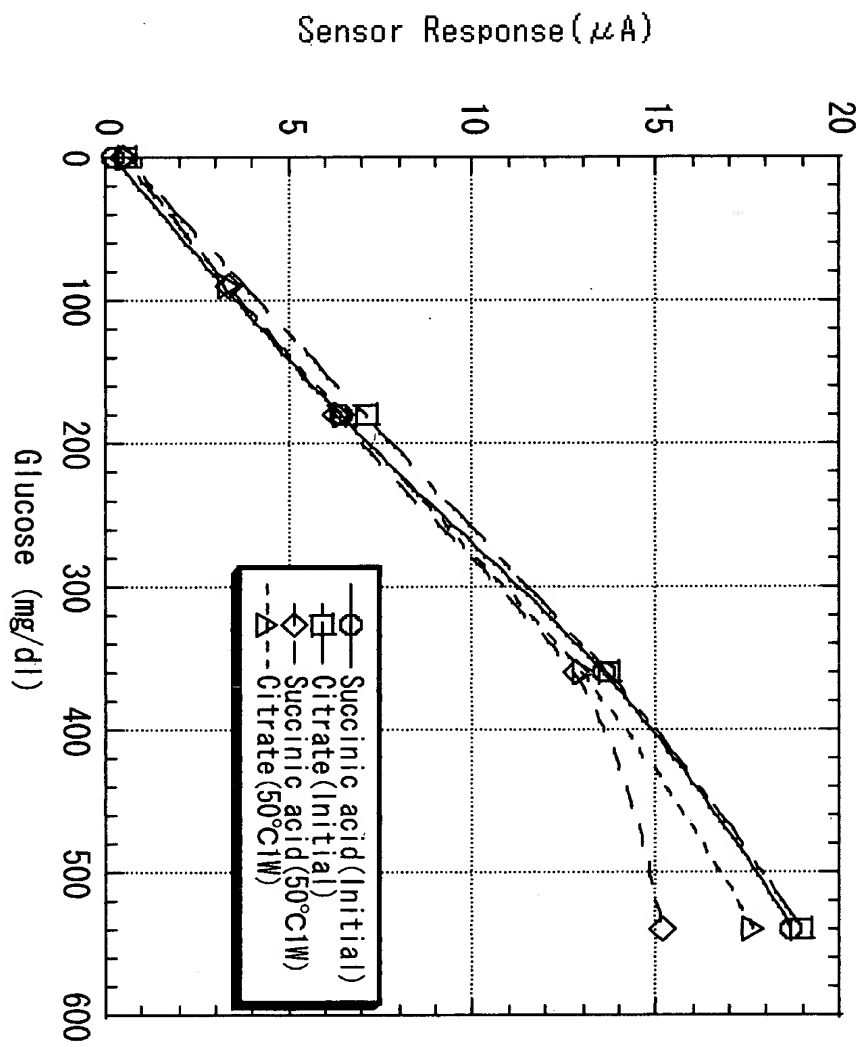
09/406,832

9. I declare further that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Keiko Yugawa
Name of Declarant

April 17, 2003
Date

APR 21 2003
PATENT & TRADEMARK OFFICE
JCR





24
Stack

Docket No.: 43888-098

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of	:	
	:	
Keiko YUGAWA, et al.	:	
	:	
Serial No.: 09/406,832	:	Group Art Unit: 1741
	:	
Filed: September 28, 1999	:	Examiner: A. Noguerola
	:	
For: GLUCOSE SENSOR	:	

DECLARATION UNDER 37 C.F.R. § 1.132

1. I, Koichi NAKA, willfully make the following Declaration regarding the above-captioned application. I declare and say as follows:

2. The above-captioned application claims priority to and corresponds to Japanese Priority Application Hei 11-212703, attached hereto as Exhibit A (hereinafter referred to as "Japanese Priority Application").

3. The Japanese Priority Application lists "collidine" among the compounds that can be added to the reaction layer of the glucose sensor. Examples of the term "collidine" expressed in the Japanese language in the Japanese Priority Application can be found in claims 1, 3 and 4 and paragraphs [0007, 0008, 0009, 0011, 0030] and in table 1.

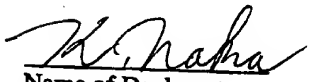
4. In the Japanese language, the terms "collicine" and "colicin" are similar in their appearance.

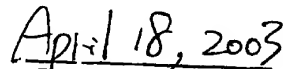
5. The term "collidine" in the Japanese language was erroneously translated to "colicin" in the English language in above-captioned application. This error can be found on pages 5, 6, 10, 23 (Table 1), 26 (original claim 1), and 27 (original claims 3 and 4) of the above-captioned application.

09/406,832

6. I certify that the correct English language translation of the Japanese Priority Application should be "collidine" rather than "colicin" in the above identified pages of the above-captioned application.

7. I declare further that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.


Name of Declarant


Date



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-171428

(P2000-171428A)

(43) 公開日 平成12年6月23日 (2000.6.23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 27/327		G 0 1 N 27/30	3 5 3 S
27/416		27/46	3 3 8

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平11-212703
(22) 出願日 平成11年7月27日 (1999.7.27)
(31) 優先権主張番号 特願平10-276153
(32) 優先日 平成10年9月29日 (1998.9.29)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005821
松下電器産業株式会社
大阪府門真市大字門真1006番地
(72) 発明者 湯川 系子
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内
(72) 発明者 吉岡 俊彦
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内
(74) 代理人 100072431
弁理士 石井 和郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルコースセンサ

(57) 【要約】

【課題】 保存安定性が高く、ブランク値の小さい高性能なグルコースセンサを提供する。

【解決手段】 電気絶縁性基板、前記基板上に設けられた電極系、および前記電極系に接してまたはその近傍に形成され、少なくともヒドロキノンリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼを含む反応層を具備するグルコースセンサにおいて、前記反応層にフタル酸などの添加剤を添加する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 電気絶縁性基板、前記基板上に設けられた少なくとも作用極と対極を有する電極系、および前記電極系に接してまたはその近傍に形成され、少なくともピロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼを含む反応層を具備するグルコースセンサであって、前記反応層が、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を含むことを特徴とするグルコースセンサ。

【請求項2】 前記グルコースデヒドロゲナーゼが、前記添加剤によって被覆されていることを特徴とする請求項1記載のグルコースセンサ。

【請求項3】 ピロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼに、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を配合することを特徴とするグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【請求項4】 ピロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼと、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を含むことを特徴とするグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、試料中の特定成分を迅速かつ簡便に高精度で定量することができるグルコ

ースセンサに関する。さらに具体的には、本発明は、ピロキノリンキノンを補酵素としたグルコースセンサ用のグルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法、および安定化したグルコースデヒドロゲナーゼ組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来から、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく試料液中の特定成分を簡易に定量する方式として、様々なバイオセンサが提案されている。バイオセンサの一例として、例えば次のようなセンサが知られている(特開平2-062952号公報)。このバイオセンサは、絶縁性基板上にスクリーン印刷などの方法で作用極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体を含む酵素反応層を形成することによって作製されるものである。このようにして作製したバイオセンサの酵素反応層上に基質を含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して酵素と基質が反応し、これにともなって電子受容体が還元される。酵素反応終了後、還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めることができる。上記のようなバイオセンサによれば、原理的には、測定対象物質を基質とする酵素を選択することによって、様々な物質の測定が可能である。例えば、酵素にグルコースオキシダーゼを選択すると、試料液中のグルコース濃度を測定するグルコースセンサを作製することができる。

【0003】 上記のような構成のバイオセンサでは、通常、酵素は、乾燥状態でセンサ内に保持されている。酵素は、蛋白質を主成分とするため、空気中などの水分に長期間接すると、変性してしまう危険性がある。また、極端な場合、酵素が失活してしまう危険性がある。そのため、センサを長期間保存すると、酵素の活性が低下して、基質と反応する酵素量が不足してしまい、得られる応答電流値が基質の濃度に比例しなくなる場合がある。また、通常、基質濃度が0の試料液をセンサ内に導入しても、ある程度のセンサ応答電流値(以下、「ブランク値」という。)が得られる。このブランク値が得られる原因の一つとして、センサ内に導入され、反応層を溶解した試料液に含まれるイオンが、基板上の電極表面に溜まり、電極反応を起こすことが考えられる。このブランク値が大きいと、応答電流値と基質の濃度との相関性が低下する要因となるため、基質の正確な定量ができなくなる。

【0004】 したがって、保存安定性に優れ、ブランク値の小さいバイオセンサを得るためには、酵素の近傍に、酵素の活性が長期間保持されるような環境を整えることが重要である。また、ブランク値が無視できる程度に小さくなるような環境を、基板上の電極表面付近に与えることも重要である。さらに、酵素反応時に電子や基質の移動が円滑に行われるようにし、センサの応答性を

高めることも必要である。上記のような問題点を解決するため、従来は、リン酸などの添加剤を反応層に添加していた。

【0005】一方、高性能なグルコースセンサを作製するため、従来は、酵素としてピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼ（以下、「PQQ-GDH」という。）を用いていた。PQQ-GDHを用いるグルコースセンサは、PQQ-GDHそのものの触媒反応に酸素が関与しないため、酵素反応が血中などの溶存酸素の影響を全く受けないという特性を有する。そのため、このグルコースセンサによって得られる測定値は、試料液中の酸素分圧によってばらつくことがない。すなわち、高性能なセンサを得ることができる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかし、酵素としてPQQ-GDHを用いた場合、前述したリン酸などの添加剤を反応層に添加しても、得られるバイオセンサのブランク値を十分に小さくすることができず、また、保存安定性も十分に向上させることができないという問題があった。本発明は、このような問題点に鑑み、保存安定性が高く、ブランク値が小さい高性能なグルコースセンサを提供することを目的とする。さらに、本発明は、PQQ-GDHの安定化方法、および安定化されたグルコースデヒドロゲナーゼ組成物を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明によるグルコースセンサは、電気絶縁性の基板、前記基板上に設けられた少なくとも作用極と対極を有する電極系、および前記電極系に接してまたはその近傍に形成され、少なくともピロロキノリンキノンを補酵素として結合したグルコースデヒドロゲナーゼを含む反応層を具備するグルコースセンサにおいて、前記反応層に、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス（ヒドロキシメチル）グリシン、トリス（ヒドロキシメチル）グリシンの塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を添加することを特徴とする。ここにおいて、前記酵素が、前記添加剤によって被覆されていることが好ましい。

【0008】また、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼに、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチル

グルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス（ヒドロキシメチル）グリシン、トリス（ヒドロキシメチル）グリシンの塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を配合することを特徴とするグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法にも関する。

【0009】さらに本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼに、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス（ヒドロキシメチル）グリシン、トリス（ヒドロキシメチル）グリシンの塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンよりなる群から選択される少なくとも1種の添加剤を配合してなることを特徴とするグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼ組成物にも関する。

【0010】

【発明の実施の形態】上記のように、本発明のグルコースセンサは、酵素としてPQQ-GDHを含む反応層に、フタル酸などの添加剤を含ませたものである。上記のような添加剤、例えばフタル酸水素カリウムとPQQ-GDHの混合溶液を滴下し乾燥して反応層を形成すると、酵素表面がフタル酸水素カリウムによって取り囲まれるため、温度、湿度、電荷の状態などの環境の変化から酵素を保護することができる。その結果、酵素の活性を長期間安定させることができるのである。また、前記添加剤は、センサ内に試料液が導入されると溶解してイオン化し、試料液に含まれていたイオンや、反応層の溶解によって生じたイオンに影響を与える。その結果、イオンが基板上の電極表面に溜まらず、ブランク値を小さくすることができることになるのである。さらに、上記のような添加剤を反応層に含ませると、反応層が水に容易に溶けるため、試料溶液を反応層に添加すると、反応層は直ちに溶解し、酵素反応と電極反応を円滑に進めることができて都合がよい。

【0011】上記のような効果が期待できる添加剤には、フタル酸、フタル酸水素カリウムなどのフタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸ナトリウムなどのマレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸ナトリウムなどのコハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミン塩酸塩などのトリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸一カリウム、クエン酸カルシウム、クエン酸三カリウム、クエン酸三ナトリウム、クエン酸三リチウム、ク

エン酸水素二アンモニウム、クエン酸水素二ナトリウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸二アンモニウム、クエン酸二水素カリウム、クエン酸二水素ナトリウム、クエン酸二ナトリウム、クエン酸マグネシウムなどのクエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸の塩、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩などのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩、イミダゾールおよびコリジンなどがあげられる。特に、フタル酸水素カリウムを用いると、保存安定性および応答特性に優れ、ブランク値の非常に小さいグルコースセンサを得ることができる。

【0012】これらの添加剤はすべて緩衝剤として使用することのできる化合物であり、必要に応じて塩酸、酢酸などの酸やNaOH、KOHなどのアルカリにより所定のpHに調整して添加すればよい。好適なpHは、5.0~8.5である。もちろん、ほかの緩衝液にこれらの添加剤を配合したものを用いてもよい。また、前記添加剤の添加量としては、PQQ=GDH250~10000U/mlに対して5~80μMという範囲であればよく、安定性と低ブランク値であるという理由から、10~50μMであるのが好ましい。なお、Uはunitを表す。

【0013】本発明の反応層には、酵素反応に伴って還元される電子受容体を含むものでよい。この電子受容体には、フェリシアン化イオン、p-ベンゾキノンおよびその誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体などを用いることができる。

【0014】本発明の反応層には、親水性高分子を含むものでよい。反応層中に親水性高分子を添加することにより、電極系表面からの反応層剥離を防ぐことができる。さらに、親水性高分子は、反応層表面の割れを防ぐ効果も有しており、バイオセンサの信頼性を高めるのに効果的である。このような親水性高分子としては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシアプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジンなどのポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸およびその塩の重合体、メタクリル酸およびその塩の重合体、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩の重合体、アガロースゲルおよびその誘導体が好適に用いられる。

【0015】バイオセンサ内における反応層は、電気絶縁性基板上に形成された電極系上のほか、本発明の効果を損なわない限り、種々の位置に配置することができ

る。例えば、前記基板の電極系上以外の場所にも配置することができる。また、バイオセンサは、カバー部材を含む。このカバー部材は、前記基板に組み合わされて基板との間に前記電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するが、このカバー部材の試料液供給路に露出する面に前記反応層を配置することもできる。酸化電流の測定方法としては、作用極と対極のみの二電極方式と、参照極を加えた三電極方式があり、三電極方式の方がより正確な測定が可能である。

【0016】また、本発明は、前述した添加剤を、ピロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼに添加することにより、グルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼを安定化する方法にも関する。添加の方法としては、本発明の効果を損なわない方法であれば特に制限はない。さらに、本発明は、ピロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼと前記添加剤を含むグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼ組成物にも関する。

【0017】ここで、本発明の安定化組成物には、前記添加剤に加えて、本発明の効果を損なわない範囲で他の安定化剤を添加しても構わない。このような安定化剤としては、例えば金属塩、蛋白質、アミノ酸、糖、有機酸、界面活性剤などをあげることができる。金属塩としては、例えばカルシウム、ストロンチウムおよびマンガンなどのハロゲン化物のほか、これらの硫酸塩、硝酸塩などでもよい。蛋白質としては、酵素活性に影響を与えないものであるのが好ましく、例えばウシ血清アルブミン(BSA)、卵アルブミン、ゼラチンなどをあげることができる。アミノ酸としては、例えばリジン、ヒスチジン、グルタミン酸などの一般的なもののほか、グリシルグリシン、ポリリジンなども用いることができる。なかでも、水溶性の高いものが好ましい。

【0018】糖としては、単糖、二糖、オリゴ糖および多糖など、種類を問わずに用いることができる。また、これらの誘導体も用いることができる。具体的には、例えばグルコース、フラクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、マルトトリオース、マルトシルサイクロデキストリン、α-サイクロデキストリン、β-サイクロデキストリン、γ-サイクロデキストリン、デキストリン、アミロース、グリコーゲン、デンプン、イヌリン、グルコサミン、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、リビトールおよびデオキシグルコースなどをあげることができる。有機酸としては、例えばα-ケトグルタル酸、リンゴ酸、フマル酸、グルコン酸、コール酸およびデオキシコール酸などがあげられる。界面活性剤としては、非イオン性のものが好ましい。その他、ホウ酸、ホウ砂、塩化カリウム、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、グリセロール、フィコール、EDTA、EGTA、DTT、DTE、GSH、2-メルカプトエ

タノールなどを添加してもよい。これらの安定化剤の添加量は、グルコースデヒドロゲナーゼ1.0重量部に対して安定化剤0.0001~1.0重量部が好ましい。

【0019】上述の添加剤を含み、さらに要すれば前記安定化剤を含む本発明のピロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼ組成物は、安価に、しかも酵素の基本性能に悪影響を与えることなくその活性を保持することができる。また、本発明における補酵素であるピロキノリンキノンは、いずれの起源のものも用いることができる。

【0020】ここで、ピロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼの活性の測定方法について説明する。試薬としては、5.0mMのPIPES緩衝液、0.2mMのPMS (pH6.5)、0.2mMのNTB、30.6mMのグルコース、0.19%のトリトンX-100の混合試薬を用いる。この混合試薬3mlを37℃で約5分間予備加熱した後、0.1mlの酵素溶液を添加し、緩やかに攪拌する。その後、水を対照として、37℃に制御した分光光度計で、その吸光度を5分間記録する。そして、記録された直線部分から1分間あたりの吸光度変化を算出する。また、盲検は、酵素溶液の代わりに蒸留水を前記混合試薬に添加して吸光度を測定することにより行う。このような方法によって1分間に1/2マイクロモルのジホルマゼンを生産する酵素量を1単位(U)とする。以下に、実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0021】

【実施例】図1は、本発明の一実施例におけるバイオセンサの反応層を取り除いた概略平面図である。ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード2、3を形成している。ついで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して作用極4を形成している。この作用極4は、リード2と接触している。さらに、この基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成している。絶縁層6は、作用極4の外周部を覆っており、これにより作用極4の露出部分の面積を一定に保っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように基板1上に印刷してリング状の対極5を形成している。図2は、図1のバイオセンサの概略縦断面図である。図1に示すように作製した電極系上に、親水性高分子層7が形成され、この親水性高分子層7の上にPQQ-GDHと添加剤を含む反応層8が形成されている。

【0022】《実施例1》図1の基板1の電極上に、親水性高分子であるカルボキシメチルセルロースのナトリウム塩(以下、「CMC」と略す。)の0.5wt%水溶液を滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させ、CMC層7を形成した。続いて、PQQ-GDH5

000ユニットとフタル酸水素カリウム20μMおよびフェリシアン化カリウム50μMを水1mlに溶解した混合溶液をCMC層7上に滴下し乾燥して、反応層8を形成した。このようにしてグルコースセンサを作製した。つぎに、試料液として、種々の濃度に調整したグルコース水溶液を調製した。そして、この試料液を反応層8上に滴下した。グルコースを含む試料液が反応層に供給されると、試料内のグルコースはPQQ-GDHにより酸化される。そして、これと同時に反応層中のフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。

【0023】試料液を滴下してから1分後に、対極5を基準にして作用極4に+0.5Vの電圧を印加して、フェロシアン化カリウムを酸化した。そして、5秒後に対極と作用極の間を流れる電流値を測定した。同様に、種々の濃度のグルコース水溶液に対する電流値を測定し、横軸にグルコース濃度、縦軸に電流値をプロットしてセンサの応答特性図を作成した。その結果を図3に示す。また、同様に作製したバイオセンサを6ヶ月間保存した後、このバイオセンサの応答特性図を作成した。その結果を図4に示す。図3より、得られたセンサのブランク値が非常に小さいことがわかる。また、濃度と電流値との間には一定の相関性があり、優れた直線性を示している。作製直後のセンサと6ヶ月保存後のセンサの応答特性にはほとんど差はなく、得られたセンサの保存性が優れていることがわかった。

【0024】《比較例1》フタル酸水素カリウムの代わりに、リン酸カリウムを添加した以外は、実施例1と同様にグルコースセンサを作製した。そして、実施例1と同様に、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。その結果を図3に示す。このセンサは、図3より明らかなように、ブランク値が高く、グルコース濃度が110mg/dlよりも低濃度域では、グルコース濃度を反映した真の電流値よりも高い応答電流値を示した。逆に、グルコース濃度が110mg/dlよりも高濃度域になると、応答電流値は、実施例1よりも低くなり、グルコース濃度と電流値との直線性も低下した。また、6ヶ月間保存後のセンサは、直線性が作製直後のセンサよりもさらに低下し、得られたセンサの保存性はよくなかった。

【0025】《比較例2》フタル酸水素カリウムを加えなかった以外は、実施例1と同様にグルコースセンサを作製した。そして、実施例1と同様に、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。その結果、得られたセンサのブランク値は、非常に大きく、また、基質濃度が増加しても、応答電流値はあまり増加しなかった。また、6ヶ月間保存後のセンサは、酵素が失活し、基質濃度が増加しても、応答電流値はほとんど増加しなかった。

【0026】《実施例2》電極上にCMC層7を形成し

ない以外は、実施例1と同様にしてグルコースセンサを作製した。そして、実施例1と同様にして、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。その結果、グルコース濃度と電流値との間には、一定の相関性があり、良好な直線性を有していた。ブランク値も小さかった。また、センサ作製直後と6ヶ月保存後のセンサの応答特性にはほとんど差はなく、良好な保存性を示した。

【0027】《実施例3～10》フタル酸水素カリウムの代わりにマレイン酸(実施例3)、こはく酸(実施例4)、トリエタノールアミン塩酸塩(実施例5)、クエン酸2水素ナトリウム(実施例6)、ジメチルグルタル酸(実施例7)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(実施例8)、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン(実施例9)またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(実施例10)を添加したほかは、実施例1と同様にしてグルコースセンサを作製し、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。この応答特性図を図4～図11に示す。図4～図11から、得られたセンサのブランク値が非常に小さく、濃度と電流値との間に一定の相関性があるのがわかる。また、応答性が高く、良好な直線性を示した。さらに、センサ作製直後と6ヶ月保存後のセンサの応答特性にはほとんど差はなく、良好な保存性を示した。

【0028】《実施例11～18》電極上にCMC層7を形成しないほかは、実施例3～10と同様にしてグルコースセンサを作製し、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。その結果、グルコース濃度と電流値との間に一定の相関性があり、良好な直線性を示した。得られたセンサのブランク値も非常に小さかった。さらに、センサ作製直後と6ヶ月保存後のセンサの応答特性にはほとんど差はなく、良好な保存性を示した。

【0029】《実施例19》本発明のピロロキノリンキノン(補酵素)としたグルコースデヒドロゲナーゼ10U/mlを、1mMの塩化カルシウムを含む20mMの各種添加剤(緩衝液)に添加し、37℃で3日間保持し、活性残存率(溶解直後の活性値に対する活性値の割合)を調べた。ただし、リン酸カリウム緩衝液には塩化カルシウムを添加しなかった。各添加剤中における活性残存率を表1に示す。

【0030】

【表1】

緩衝液の種類	pH	残存活性(%)
フタル酸水素カリウム	6.0	100
マレイン酸	6.5	100
コハク酸	6.0	100
トリエタノールアミン	7.0	100
クエン酸2水素ナトリウム	6.5	100
ジメチルグルタル酸	6.5	100
トリシン	7.5	95.4
イミダゾール	7.5	100
コリジン	6.5	96.1
トリス塩酸	7.5	63.4
リン酸カリウム	6.5	44.3

【0031】表1から、従来から汎用されている緩衝液であるリン酸カリウム緩衝液、トリス塩酸緩衝液に比べて、本発明における添加剤によれば、良好な安定性が得られることがわかる。

【0032】《実施例20》1mMの塩化カルシウムおよびBSAを含む各種添加剤(緩衝液)に、本発明のピロロキノリンキノン(補酵素)としたグルコースデヒドロゲナーゼを溶解した。なお、BSAは、グルコースデヒドロゲナーゼ1.0重量部に対して0.3重量部混合した。得られた溶液を凍結乾燥して37℃で1週間保存した後、その活性残存率(溶解直後の活性値に対する活性値の割合)を調べた。結果を表2に示す。

【0033】

【表2】

緩衝液の種類	pH	残存活性(%)
トリス塩酸	7.5	22.1
リン酸カリウム	6.5	66.2
フタル酸水素カリウム	6.0	83.2
マレイン酸	6.5	72.1
コハク酸	6.0	80.5

【0034】表2から、従来から汎用されている緩衝液であるリン酸カリウム緩衝液、トリス塩酸緩衝液に比べて、本発明における添加剤によれば、凍結乾燥を行って作製した酵素製品の安定性のほうが優れていることがわかる。

【0035】

【発明の効果】上記のように、本発明によれば、長期保存性の優れ、ブランク値の低い高性能なグルコースセンサを得ることができる。また、従来よりも安定性に優れたピロロキノリンキノン(補酵素)としたグルコースセンサ用グルコースデヒドロゲナーゼ組成物を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例におけるグルコースセンサの反応層を除いた概略平面図である。

【図2】図1に示すグルコースセンサの要部の縦断面図である。

【図3】本発明の一実施例および比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図4】本発明の一実施例および比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図5】本発明の一実施例および比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図6】本発明の一実施例および比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図7】本発明の一実施例および比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図8】本発明の一実施例および比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図9】本発明の一実施例および比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

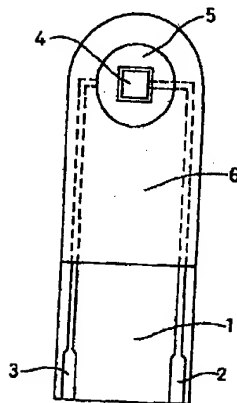
【図10】本発明の一実施例および比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

【図11】本発明の一実施例および比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

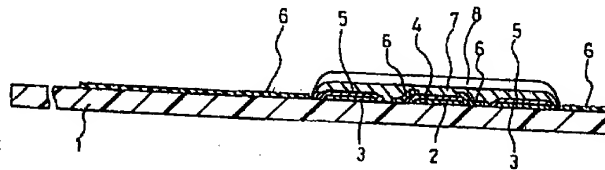
【符号の説明】

- 1 絶縁性基板
- 2、3 リード
- 4 作用極
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 CMC層
- 8 反応層

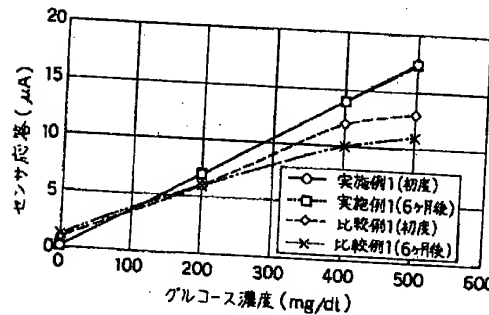
【図1】



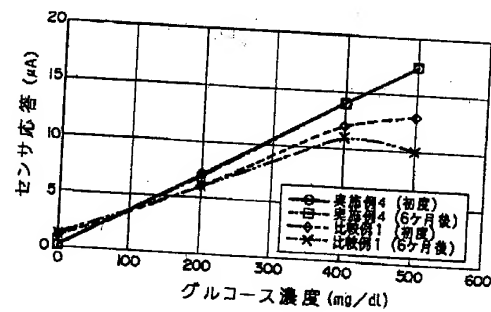
【図2】



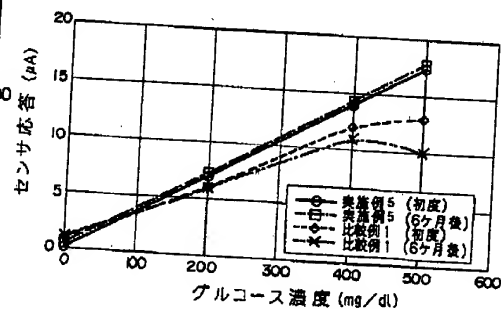
【図3】



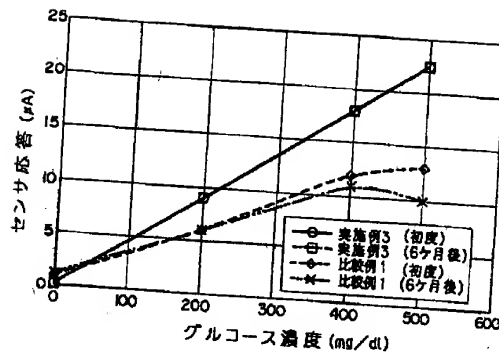
【図5】



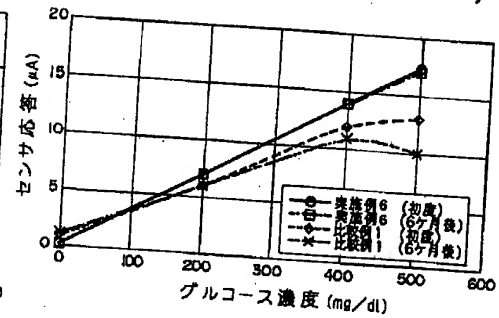
【図6】



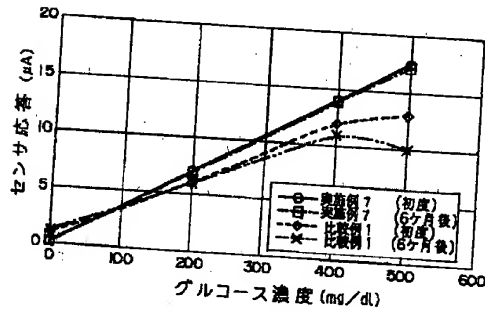
【図4】



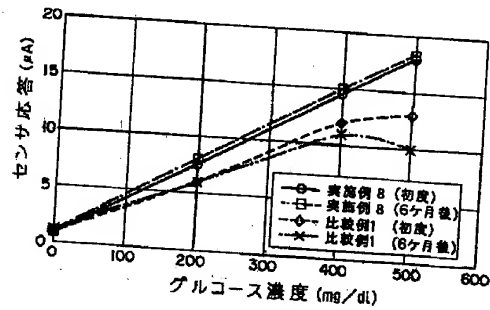
【図7】



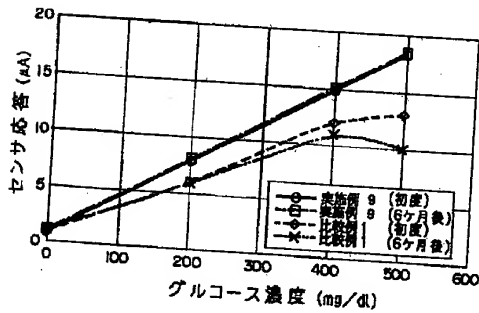
【図8】



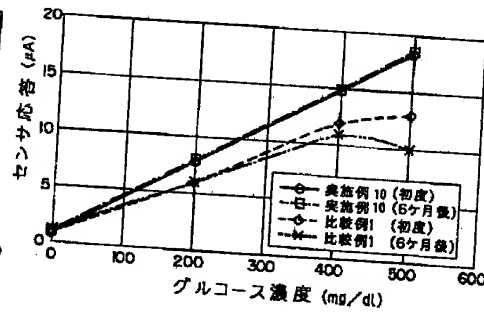
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(72)発明者 南海 史朗
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内
(72)発明者 岩田 潤子
香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電
子工業株式会社内

(72)発明者 宮崎 正次
香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電
子工業株式会社内
(72)発明者 馬場 英行
香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電
子工業株式会社内

!(9) 000-171428 (P2000-17問8

(72)発明者 竹嶋 誠嗣
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内